

附件 3

代谢动力学试验方法

Toxicokinetics Test

1 范围

本方法规定了代谢动力学试验的基本原则、要求、方法和结果评价。

本方法适用于结构明确的化妆品用化学原料代谢动力学参数测定，若应用于纳米材料，需提供更多的科学证据以证明其适用性。

2 试验目的

通过研究结构明确的化妆品用化学原料的代谢动力学，获得有关其吸收、分布、代谢和排泄的信息，分析浓度或剂量与观察到毒性的关系，以阐明其毒性机制。

3 定义

3.1 代谢动力学 toxicokinetics

研究受试物在体内的吸收、分布、代谢和排泄过程中随时间发生量变规律的科学。

3.2 吸收 absorption

受试物或其代谢产物通过生物膜进入体循环的过程。

3.3 分布 distribution

进入体内的受试物向机体的体液、组织、脏器转运的过程。

3.4 代谢 metabolism

进入体内的受试物在体液 pH、酶系统或肠道菌群等作用下发生化学结构变化的过程。

3.5 排泄 excretion

已被吸收的受试物或其代谢产物排出体外的过程。

3.6 代谢产物 metabolites

受试物在体内经生物转化后形成的化学结构改变的产物。

3.7 蓄积 accumulation

受试物随着暴露时间延长而在组织或器官中含量异常增加的现象。如果受试物进入体内速度大于其消除速度，机体就会蓄积受试物并达到毒性作用浓度。

3.8 受试物浓度-时间曲线下面积 AUC area under the plasma concentration-time curve

受试物在血液中浓度随时间变化的曲线下面积,代表机体在一段时间内吸收进入全身血液循环的受试物的总量。

3.9 峰浓度 $C_{\max}$

受试物经血管外途径暴露后血液(血浆/血清)中的最大(峰值)浓度或尿液/粪便中的最大(峰值)排泄量。

3.10 达峰时间 $T_{\max}$

暴露后达到峰浓度所需的时间。

3.11 末端消除半衰期 $t_{1/2}$ terminal half-life

末端相(消除相)中,受试物在体内的量或浓度减少一半所需的时间,其单位为“min”或“h”。

3.12 生物利用度 bioavailability

受试物进入机体全身循环的量或进入生理活性部位的量占总剂量的百分比。一般情况下,生物利用度是指原型化合物的生物利用度,但也可以指代谢产物的生物利用度。

3.13 物质平衡 mass balance

通过定量分析受试物及其代谢产物在生物体系(如体内、体外或排泄系统)中的分布、排泄途径和速率,评估受试物及其代谢产物的总回收率,明确其体内处置的完整性。

4 试验的基本原则

受试物通过适当的途径暴露,在规定的时间内,对一组或几组试验动物分别给予一次暴露或多次暴露。按照研究的要求,测定体液、脏器、组织、排泄物中受试物和/或其代谢产物的量或浓度的经时变化,选择受试物在体内处置的合适模型,进行受试物浓度-时间曲线拟合,计算有关的代谢动力学参数。

5 试验方法

5.1 受试物

在开展物质平衡及代谢产物鉴定时,通常需使用 ^{14}C 等放射性同位素标记的受试物。以下情况除外:

- (1) 有研究证实,未标记受试物足以完成物质平衡评估和代谢产物鉴定;
- (2) 有数据证明,非放射性方法的检测特异性与灵敏度不低于放射性同位素标记法;
- (3) 其他经科学论证的特殊情况。

应使用适当的方法对放射性同位素标记和非放射性同位素标记的受试物进行分析，以确定其纯度和特性。放射性同位素标记的受试物的放射化学纯度应不低于 95%，非放射性同位素标记的受试物的纯度应不低于 98%。

5.2 实验动物和饲养环境

5.2.1 动物种属和品系

尽可能选用与其他毒理学试验相同的品系。一般首选大鼠，如 SD 大鼠或 Wistar 大鼠。理想情况下，所使用的品系应与得出该受试物的毒理学数据时使用的品系相同。在使用其他种属或品系动物的情况下，应在试验报告中说明理由。

5.2.2 年龄和体重

应使用 SPF 级动物，通常选用 6~12 周龄的大鼠，使用其他周龄的成年动物应提供理由。若选择雌性，应为未孕或未曾产仔的。动物体重的变动范围不应超出平均动物体重的 20%。

5.2.3 数量和性别

每个剂量组应至少使用 4 只同一性别的动物。如果有证据证明在毒性方面存在明显的性别差异，则应考虑使用两种性别（4 只雄性和 4 只雌性）。

5.2.4 饲养环境

饲养环境应满足动物福利需求，符合动物伦理要求。实验动物、动物设施、配合饲料及饮水应符合国家相关规定。应选用标准配合饲料，并保障动物自由饮水。在符合科学目的的前提下，应为单笼饲养的动物提供必要的环境丰富化措施，以促进其表达正常行为，减轻应激。

5.3 暴露剂量

预试验：在试验开始前，通常要进行预试验。通常选择一个剂量，一般选择无毒剂量，并保证在生物样品中有足够浓度的原型化合物可定量测定或足够浓度的代谢产物便于分析鉴定。

正式试验：至少设置 2 个剂量组，低剂量组应低于最大无毒作用剂量，高剂量组应能出现毒性作用或引起代谢动力学参数的改变，但不会引起严重中毒。高、低剂量按照合适的比例设置。在选择剂量时，应考虑现有毒性数据的信息（例如，来自急性毒性试验或重复剂量毒性试验的信息）。如果缺少信息，可以考虑低于 LD₅₀（经口和经皮暴露）或 LC₅₀（吸入暴露）估计值或低于急性毒性范围估计值的较高剂量值。对于低毒性的物质，应使用 1000 mg/kg 的最大剂量（经口和经皮暴露）或 2 mg/L 的最大剂量（吸入暴露）。

分布和排泄试验通常选择一个剂量（一般以有效剂量为宜），该剂量应能保证在生物样品中有足够浓度原型或代谢产物可鉴定，同时不会产生明显毒性。静脉注射暴露通常选择一个剂量，该剂量应等于或小于血管外暴露的低剂量。当用放射性同位素标记的受试物暴露时，应考虑到所用剂量中放射性的强度，防止放射性损伤所致的代谢动力学特征的改变。

5.4 暴露途径

暴露途径应尽可能与人体实际暴露的情况相同,根据受试物的性质和试验目的可采用经皮、经口、吸入或静脉注射暴露。

经皮暴露:根据暴露剂量,将受试物溶解在一定体积的溶媒中。溶媒需满足以下要求:在暴露实验周期内,不得引发皮肤显著刺激性反应,且不得对血液学检测指标产生影响。在试验前 24 h,采用剃毛法剔除动物躯干背侧区域的毛发。受试物涂敷面积约占动物体表面积 10%,对于高毒性的物质,可少于体表面积的 10%。涂敷区域应采用适当的方法覆盖加以保护,暴露后的动物应单笼饲养。受试物至少与皮肤接触 6 h 后去掉涂敷物,用温和皂液和清水对涂敷部位进行冲洗,并测定冲洗液中受试物的回收率,以评价受试物经皮暴露吸收的程度。

经口暴露:通常采用灌胃的方式。采用灌胃方式暴露时,溶解或混悬受试物的溶媒应与其他毒理学试验相同,并提供溶媒选择合理性的依据。灌胃体积应根据动物大小、介质类型和暴露前是否禁食的具体情况而定。水溶性或非水溶性溶媒均应以实际可操作并且尽可能低的体积灌胃。啮齿类动物的灌胃体积通常为 10 mL/kg,不超过 20 mL/kg。

吸入暴露:通常采用口鼻式暴露装置,口鼻式暴露时间通常为 4 h,暴露期间应禁食禁水。暴露于气溶胶的动物应单笼饲养,避免摄入受试物。

静脉注射暴露:静脉注射暴露有助于了解受试物的代谢动力学基本特征或为计算血管外途径暴露吸收程度提供信息。将受试物完全溶解在合适的溶媒中,并选择合适的注射体积和部位进行静脉暴露。所使用的溶媒不能对血液成分和血流产生明显影响。如果采用静脉注射暴露,每只动物的注射速度应统一标准化,如大鼠静脉注射速度不超过 0.5 mL/min。如果采用颈静脉或股动脉插管进行暴露或采血,由于插管前必须实施麻醉,应充分评估麻醉方式是否对代谢动力学参数产生影响。受试物暴露或采血应在动物完全清醒状态下进行。

5.5 样本采集

当血液中受试物暴露量无法反映靶组织或器官的毒性反应时,需要考虑采用尿液、其他体液、靶组织或器官来测定受试物浓度。

血样经静脉或动脉采取,采血时间点应包含吸收相、平衡相(峰浓度附近)和消除相,采样时间持续到 3~5 个半衰期或持续到受试物浓度为 $C_{\max}$ 的 1/10~1/20,采血总量一般为动物血容量的 10%~15%,最大不超过 20%。

尿样按一定的时间间隔(如 0~6 h、6~12 h、12~24 h)分段收集,并在每个集尿时间段的中间点(如 3 h、9 h、18 h)采集血样,以计算肾清除率。

呼出气体样本需要根据研究目的和动物大小选择合适的呼吸气体收集装置,常见的装置包括呼吸面罩、呼吸气袋、气管插管等。

脏器组织样本采用麻醉后放血的方法处死动物后剖取,防止血液瘀滞影响脏器组织中受试物的定量测定结果。

5.6 分离和测定方法

建立生物样本中受试物及代谢产物的分离和测定方法，根据受试物的性质选择色谱-质谱联用法或放射性同位素标记法。方法应满足专属性强、灵敏度高、线性范围宽、准确度高、精密度好的要求。用放射性同位素标记受试物时，应根据标记同位素射线的性质建立相应的测定放射活性的方法。放射活性的测定应结合层析等分离技术进行，以了解代谢产物谱、生物转化程度和速率。

5.7 试验步骤

5.7.1 吸收

受试物主要有三种吸收方式，分别为经消化道、皮肤和呼吸道吸收。

经消化道、皮肤和呼吸道吸收是指受试物通过消化道、皮肤和呼吸道进入血液循环的过程。生物利用度可以通过比较静脉注射和血管外两种暴露方式的受试物浓度来计算。计算公式如下：

$$F = \frac{AUC_{\text{ext}} \times D_{\text{iv}}}{AUC_{\text{iv}} \times D_{\text{ext}}} \times 100\%$$

F ：生物利用度（以百分比表示）；

AUC_{iv} ：静脉注射的受试物浓度-时间曲线下面积；

AUC_{ext} ：血管外暴露的受试物浓度-时间曲线下面积；

D_{iv} ：静脉注射剂量；

D_{ext} ：血管外暴露剂量。

5.7.2 分布

研究受试物在体内的组织分布可以确定毒性靶组织，阐明毒性作用机制。组织分布的研究包括以下步骤：

（1）选择合适的时间点采集组织样本：通常情况下，吸收相、平衡相和消除相各选择1个时间点。如果在试验结束时，因半衰期短，受试物已被消除，导致组织中没有检测到任何受试物相关物质，应注意防止对数据的误判。在这种情况下，应在受试物和/或代谢产物的浓度峰值研究组织分布。此外，可能需要在其他时间点收集组织，以确定受试物和/或其代谢产物的组织分布。

（2）选择合适的组织样本采集：应收集的组织包括肝脏、脂肪、消化道、肾脏、脾脏、全血、残余尸体、目标器官组织和对受试物的毒理学评价有潜在意义的任何其他组织（如甲状腺、红细胞、生殖器官、皮肤、眼睛等）。在亚慢性或慢性毒性试验中观察到靶器官毒性时，应考虑同步分析其它组织，以充分利用实验动物获得更多的毒性信息。

（3）样本浓度分析：测定步骤一般包括器官匀浆等，然后使用适当的分析技术分析。可以使用放射性同位素标记法对捕获的残留物进行液闪仪计数。通常采用整体放射自显影和组织显微自显影确定受试物在器官和/或组织中的分布。

5.7.3 代谢

通过收集排泄物对受试物原型和代谢产物进行鉴定和测定，其研究包括以下步骤：

(1) 每只动物收集各个时相的排泄物，如尿液、粪便、呼出气体以及胆汁等。如果样本不够或放射活性低，可将几个时相的排泄物汇集到一起，但不可跨性别或跨剂量汇集。

(2) 对代谢产物和已知标准物质进行共色谱分析，或采用结构鉴定技术进行代谢产物鉴定。共色谱法的鉴定应使用两个不同的、独立的分析系统，如反相和正相薄层色谱法、高效液相色谱法等。结构鉴定技术包括液相色谱-质谱联用法、气相色谱-质谱联用法以及核磁共振波谱法等。

5.7.4 排泄

通过测量从尿液、粪便和呼出气体中消除的放射性剂量百分比来确定暴露剂量的排泄速度和程度，这些数据有助于建立物质平衡。其研究包括以下步骤：

(1) 每只动物应放在单独的代谢单元中，经适当的时间间隔收集排泄物，如尿液、粪便和呼出气体。在每个收集期结束时，应使用适当的溶剂冲洗代谢单元，以确保最大限度地回收受试物或放射性同位素标记的受试物。排泄物应收集 7 d，或在至少回收了 90% 的暴露剂量后终止，以先发生者为准。

如果有研究表明，没有大量的受试物或放射性同位素标记的受试物从呼出的空气中排出，则不需要收集呼出气体。

(2) 对于尿液中的受试物或放射性同位素标记的受试物总量，应在收集的第一天至少选择两个时间点进行测定，其中一个时间点应在暴露后 24 h。建议选择三个或以上时间点，如暴露后 6 h、12 h 和 24 h。此后每天测定，直至研究结束。粪便中的受试物或放射性同位素标记的受试物总量一般在暴露后 24 h 开始每天测定（包含 0~24 h 的样本），直至研究结束，可以根据预试验结果调整或增加采样时间点。在特定的试验研究中，如果在 24 h 的收集期间，在呼出气体中发现少于 1% 的暴露剂量，则可以停止收集呼出气体样本。

5.7.5 血浆/血液动力学

给予受试物或放射性同位素标记的受试物后，应在适当的时间点使用合规的取样方法从每只动物身上采集血样，每只动物的可采血量可能受到重复采样对动物生理的潜在影响或分析方法灵敏度的限制。所有采集的样本均需进行个体分析。若使用放射性同位素标记的受试物，应分别分析全血和血浆，或血浆和红细胞的总放射性，以便计算血液/血浆比率。在某些情况下（如代谢产物比例高于 10%），需要鉴定原型化合物与代谢产物。在另一些情况下（如共价结合），则需要评估蛋白质结合率，以进一步开展研究。

5.7.6 酶的诱导/抑制

在以下一种或多种情况下，需要对所研究受试物的酶诱导/抑制进行研究：

- (1) 现有证据表明，毒性的增强与受试物的生物转化相关；
- (2) 现有毒性数据表明，剂量和暴露之间存在非线性关系；
- (3) 代谢产物鉴定研究结果显示，已鉴定出一种潜在的经酶诱导途径产生的有毒代谢产物；

(4) 在解释假定与酶诱导/抑制现象相关的效应时；

(5) 在不同物种或条件下，通过体外或体内试验观察到受试物的代谢特征发生明显的毒理学改变。

5.7.7 物质平衡

为评估受试物的物质平衡，需分别测定尿液（含笼具清洗液）、粪便、呼出气体各部分的放射性，计算各部分放射性之和占暴露剂量总放射性的百分比，即总回收率。一般情况下，受试物暴露量（放射量）的总回收率应大于 90%，否则应测定残余尸体和组织的总放射量。必要时应解剖动物，观察受试物及其代谢产物主要蓄积部位和组织。

6 试验结果的评价

6.1 结果处理

可通过表格形式汇总试验数据，内容应包括不同剂量组每只动物的编号、性别、体重、暴露剂量、暴露前后受试物及其代谢产物的测定值（或放射活性强度）等原始数据，并计算各剂量组上述测定值的均值、标准差及变异系数。

绘制不同暴露方式下的受试物浓度-时间曲线，并计算不同暴露方式下与吸收、分布、代谢、排泄有关的各项代谢动力学参数。对试验数据、曲线拟合和计算结果用适当的统计学方法处理。对于代谢研究，给出代谢产物的化学结构并说明其代谢途径。

6.2 结果评价

一般情况下，需结合其他毒理学试验对各项代谢动力学参数进行毒理学意义的综合评价。

6.2.1 吸收

受试物吸收的数据有助于急性毒性试验的评价和重复剂量毒性试验的剂量设计及评价。若受试物完全不吸收或无急性毒性作用，则无需进行后续的重复剂量毒性试验。

6.2.2 分布

测定受试物在组织和器官内的分布有助于对重复剂量毒性试验的评价，也可反映受试物在体内或体内有关组织和器官中的蓄积情况。

6.2.3 代谢

(1) 受试物的代谢途径和代谢速率数据可用于评价重复剂量毒性试验结果。一定剂量范围内的代谢参数变异，可反映机体毒理学反应的非线性变化。代谢的剂量依赖性资料可为重复剂量毒性试验的剂量选择提供依据。

(2) 重复剂量毒性试验中可观察到毒理学反应的变化，可能与代谢酶的诱导/抑制作用有关。

(3) 使用放射性同位素标记的受试物进行暴露后，若检测到其与体内大分子发生共价结合，该结合放射活性存在两种可能来源：一是正常的生理性中间代谢过程，二是反应性活性代谢产物的形成。

6.2.4 排泄

受试物的排泄数据可用于重复剂量毒性试验的评价。通过分析排泄量和排泄速率，可以提示受试物或代谢产物是否在体内蓄积，进而评估其蓄积水平与潜在毒性反应之间的关联。

7 试验结果的解释

代谢动力学数据可帮助评估动物毒性数据是否充分和相关，其试验结果可在有限的程度上外推到人，但它可为确定人群的允许接触水平提供有用的信息。